



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

REC'D 14 MAY 2004
WIPO
PCT

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

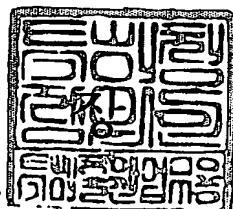
출원번호 : 10-2003-0025158
Application Number

출원년월일 : 2003년 04월 21일
Date of Application APR 21, 2003

출원인 : 재단법인서울대학교산학협력재단 외 2명
Applicant(s) Seoul National University Industry Foundation



2004년 04월 28일



특 허 청

COMMISSIONER

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.04.21
【발명의 명칭】	조류 원시생식세포의 생식선 전이 효율의 개선방법
【발명의 영문명칭】	Method for Enhancing Germline Transmission Efficiency of Avian Primordial Germ Cells
【출원인】	
【명칭】	서울대학교산학협력재단
【출원인코드】	2-2003-007067-6
【출원인】	
【명칭】	한미약품 (주)
【출원인코드】	1-1998-602636-3
【출원인】	
【명칭】	(주)아비코아생명공학연구소
【출원인코드】	1-2001-034930-9
【대리인】	
【명칭】	특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철)
【대리인코드】	9-2001-100004-2
【지정된변리사】	최홍순, 김경철, 양부현
【포괄위임등록번호】	2003-026420-1
【포괄위임등록번호】	2003-026424-0
【포괄위임등록번호】	2001-056972-5
【발명자】	
【성명의 국문표기】	한재용
【성명의 영문표기】	HAN, Jae Yong
【주민등록번호】	610409-1405718
【우편번호】	135-280
【주소】	서울특별시 강남구 대치동 316 은마아파트 17동 308호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	박태섭
【성명의 영문표기】	PARK, Tae Sub

【주민등록번호】 730629-1623812
 【우편번호】 431-058
 【주소】 경기도 안양시 동안구 달안동 샛별아파트 606동 1106호
 【국적】 KR
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 흥영호
 【성명의 영문표기】 HONG, Yeong Ho
 【주민등록번호】 660816-1479032
 【우편번호】 442-821
 【주소】 경기도 수원시 팔달구 원천동35번지 원천주공아파트 105동 910호
 【국적】 KR
 【발명자】
 【성명의 국문표기】 권세창
 【성명의 영문표기】 KWON, Se Chang
 【주민등록번호】 630620-1024818
 【우편번호】 143-210
 【주소】 서울특별시 광진구 광장동 현대아파트 802동 2205호
 【국적】 KR
 【심사청구】 청구
 【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인 특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철) (인)
 【수수료】
 【기본출원료】 20 면 29,000 원
 【가산출원료】 9 면 9,000 원
 【우선권주장료】 0 건 0 원
 【심사청구료】 15 항 589,000 원
 【합계】 627,000 원
 【첨부서류】 1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 조류의 원시생식세포의 생식전 전이 효율의 개선방법, 이를 이용한 조류 키메라 및 형질전환체의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 (a) 조류의 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포 (gonadal primordial germ cells, gPGCs)를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 원시생식세포를 최소 5일 동안 인 비트로 배양하는 단계를 포함하는 조류의 원시생식세포의 생식전 전이 효율의 개선방법에 관한 것으로서, 본 발명의 방법은 gPGCs의 생식전 전이 효율을 개선하는 데 있어서, 그 방법의 실시가 간편하면서도 그에 의해 달성되는 생식전 전이 효율의 개선 정도가 매우 크다.

【대표도】

도 1

【색인어】

조류, 생식전 전이, 원시생식세포, 배양, 키메라, 형질전환체

【명세서】**【발명의 명칭】**

조류 원시생식세포의 생식선 전이 효율의 개선방법{Method for Enhancing Germline Transmission Efficiency of Avian Primordial Germ Cells}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 닭 원시생식기-유래 기저 세포층 상에 배양된 원시생식기-유래 원시생식세포 (gonadal primordial germ cells: gPGCs)를 나타내는 사진이다. 패널 (A)는 배양 후 피콜 처리가 없는 gPGCs, 패널 (B)는 5일 동안 배양한 gPGCs, 그리고 패널 (C)는 10일 동안 배양한 gPGCs를 각각 보여준다. 배양된 gPGCs는 배양 후 7일째부터 콜로니를 형성하기 시작하였고, 배양 말기부터 기저 세포층 상에 세포 클러스터가 정착이 되었다. gPGC 콜로니의 동정은 SSEA-1 염색을 통하여 실시하였다 (화살표). 세포 퇴화를 나타내는 전형적인 특징은 관찰되지 않았고, gPGC 콜로니들은 배양 동안 컨플루언트 기저 세포층을 따라 계속적으로 느린 속도로 성장하였다 (배율 x 300).

도 2의 패널 (A)는 5.5일령 한국 오골계 (Korean Ogol Chicken, KOC) 배자의 원시생식기-유래 원시생식세포를 10일 배양 후 전이하여 생산된 화이트 레그흔 (White Leghorn, WL)을 보여주는 사진이다. 웅성의 WL은 검정교배 (자성의 KOC와 교배) 결과 생식선 키메라로 입증되었다. 패널 (B)는 검정교배에서 생식선 키메라로부터 부화된 자손을 보여준

다. WL로부터 부화된 흑색 날개의 닭들은 그 자신들이 전이된 공여체 오골계 gPGCs로부터 유래된 것임을 나타내며, 백색 날개의 닭들은 WL과 KOC의 하이브리드임을 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- <3> 본 발명은 조류의 생식선 전이 효율을 개선하는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 조류의 원시생식세포의 생식전 전이 효율의 개선방법, 이를 이용한 조류 키메라 및 형질전환체의 제조방법에 관한 것이다.
- <4> 조류 원시생식세포의 이동 패턴은 포유동물과 크게 차이가 있으며, 이러한 독특한 이동 패턴은 원시생식세포를 수용체 배자의 혈관으로 주입함으로써 생식선 키메라를 제조하는 것을 가능하게 한다. 성 성숙 후 생식세포의 전구세포인 원시생식세포는 배반엽의 외배엽으로부터 유래되며 명역의 배반엽하층으로 이동한다 (1, 2). 이 후, 원시생식세포는 혈관계를 순환하며 최종적으로 원시생식기 원기에 정착하여 콜로니를 형성한다 (3). 앞선 연구에 따르면, 생식반월 (4, 5) 또는 배자 혈관 (6)으로부터 수집한 원시생식세포를 수용체 배자로 전이하면 생식선 키메라를 형성시킬 수 있다. 그러나, 이식에 제공되는 원시생식세포를 배자 조직으로부터 수집하는 경우, 그 수가 매우 제한적이다.

- <5> 원시생식기에 자리를 잡은 (settling down) 후에는 이동 능력을 상실한다고 알려져 있다.
(3). 그러나, Chang et al (7)은 배자 원시생식기로부터 얻은 이동 단계가 지난 원시생식세포를 이동 단계의 수용체 배자에 전이한 경우, 생식선 전이를 유도할 수 있음을 발표하였다.
- <6> 한편, 생물반응기로서, 형질전환 조류는 생명공학 및 의학 분야에 형질전환 포유동물보다 큰 응용성을 갖는다 (8). 조류 생식 세포는 혈관계를 통하여 배자의 원시생식기로 이동하기 때문에, 생식 세포를 매개로 한 생식선 키메라는 형질전환 조류를 유도하는 데 가장 효율적인 수단 중 하나로 여겨지고 있다. 현재까지 닭의 생식선 키메라를 제고하기 위한 많은 시도가 있었고 (6, 9, 10), 원시생식기 유래 원시생식세포 (gonadal primordial germ cell: gPGC)의 이식 시스템은 형질전환 가금의 생산에 있어서의 많은 난점을 극복하기 위하여 개발되었다 (7, 11, 12). 본 발명자들의 앞선 연구에서, 최초로 닭 gPGCs의 전이를 통하여 생식선 키메라를 제조한 결과를 발표하였고 (7), 이 실험에서 수용체 배자의 초기 단계에 이식되어 배자의 원시생식기에 전이된 원시생식세포는 이동 능력을 회복하였다. 그러나, 상기 연구 결과에 따르면, 생식선 전이 효율은 여전히 낮은 수준을 나타내어, 이를 향상시킬 필요가 있었다.
- <7> 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 특허문헌 및 논문이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 특허문헌 및 논문의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <8> 본 발명자들은 조류의 원시생식세포의 생식선 전이효율을 개선하여 효율적으로 조류 키메라를 생산하고자 예의 연구 노력한 결과, 원시생식세포를 인 비트로 배양하면 생식선 전이효율이 크게 향상되고, 이를 이용하여 키메라를 생산하는 경우에는 생식선 키메라를 높은 효율로 생산할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- <9> 따라서, 본 발명의 목적은 조류 원시생식세포의 생식선 전이 효율을 개선하는 방법을 제공하는 데 있다.
- <10> 본 발명의 다른 목적은 생식선 전이 효율이 개선된 조류 생식선 키메라의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <11> 본 발명의 또 다른 목적은 생식선 전이 효율이 개선된 조류 형질전환체의 제조방법을 제공하는 데 있다.
- <12> 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

【발명의 구성】

- <13> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 조류의 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하는 단계; 및 (b) 상기 원시생식세포를 최소 8일 (\rightarrow 5일) 동안 인 비트로 배양하는 단계를 포함하는 조류 원시생식세포의 생식선 전이 효율을 개선하는 방법을 제공한다.

- <14> 본 발명자들은 원시생식세포 (primordial germ cell)를 이용한 형질전환 조류 또는 키메라 조류의 생산에 있어서, 최종적으로 생산된 형질전환체 또는 키메라의 생식선 전이 효율 (germline transmission efficiency)을 개선하기 위하여 다양한 시도를 하였고, 그 결과 적합한 기간 동안 인 비트로 배양된 원시생식세포를 이용하는 경우, 놀랍게도 생산된 키메라 조류의 생식선 전이 효율이 크게 증가함을 확인하였다.
- <15> 본 명세서에서 용어 "생식선 전이"는 다른 개체의 배자에 주입된 원시생식세포가 세대를 따라 자손들에게 전달되는 양상을 의미한다.
- <16> 본 발명의 방법이 적용될 수 있는 대상은 조류에 해당하는 동물로서, 바람직하게는닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거위, 꿩 및 비둘기이며, 보다 바람직하게는 닭 및 메추라기이고, 가장 바람직하게는 닭이다.
- <17> 본 발명에서 이용될 수 있는 원시생식세포는 다양한 소스로부터 얻을 수 있으나, 가장 바람직하게는 조류의 배자의 원시생식기 (embryonic gonad)로부터 분리된 것이다. 원시생식세포의 소스로서 배자를 이용하는 경우, 본 발명에서 이용되는 공여체 배자는 다양한 단계에 진입한 것이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 배 발달 스테이지 약 24-36 (약 4 일령-10 일령), 가장 바람직하게는 배 발달 스테이지 배 발달 스테이지 약 28 (약 5.5 일령)의 배자가 이용된다. 원시생식기로부터 원시생식세포를 수득하는 방법은 다양하게 실시될 수 있으며, 본 발명자들의 특허 제 0305715 호 및 특허 제 0267633 호에 개시되어 있다. 예컨대, 난황이 제거된 배자로부터 원시생식기를 회수하고, 원시생식기에 단백질분해효소 (예: 트립신)를 처리하여, 원시생식기 세포를 분리한다. 이러한 원시생식기 세포는 다양한 세포종의 군집으로서, 원시생식세포 이외에 기저세포 (stroma cells) 등이 포함되어 있다. 본 명세서에서 용어 "원시생식기 세포 (gonadal cells)"는 원시생식기에 존재하는 모든 세포 종의 군집을 의미하며, 용어

"원시생식기-유래 원시생식세포 (gonadal primordial germ cells)"는 후에 생식세포가 되는 원시생식기 세포의 일종을 나타내며, 약어 "gPGCs"로 나타낼 수 있다.

<18> 본 발명의 가장 큰 특징은 적합한 기간, 즉 최소 5일 동안 인 비트로 배양된 원시생식세포를 이용하는 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 최소 8일 동안 실시하며, 보다 바람직하게는 최소 10일 동안 실시한다. 이렇게 인 비트로 배양된 gPGCs를 이용하여 생산된 조류 키메라 또는 형질전환체는 크게 증가된 생식전이 효율을 나타낸다.

<19> 본 발명의 인 비트로 배양에 이용되는 배지는 동물세포의 배양에 이용되는 통상적인 배지가 이용될 수 있으나, 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 세포성장인자 및 분화억제인자가 포함된 배지에서 실시된다. 본 발명의 배지에서 이용되는 상기 세포성장인자는 간세포인자 (stem cell factor), 섬유아세포성장인자 (fibroblast growth factor), 인터루킨-11 (interleukin-11), 인슐린-유사 성장인자-1 (insulin-like growth factor-1) 또는 그의 혼합물을 포함한다. 본 발명의 배지에 이용되는 상기 분화억제인자는 류케미아 억제인자 (leukemia inhibitory factor)를 포함한다. 또한, 본 발명의 인 비트로 배양에 이용되는 배지는 조류 혈청 (예: 닭 혈청), 포유류 혈청 (예: 우태아 혈청) 및 그의 혼합물을 포함한다. 이외에도, 원시생식세포의 인 비트로 배양에 이용되는 배지는 소듐 피루베이트, β -머르캅토에탄올 등을 포함한다.

<20> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 원시생식기-유래 기저세포층 위에서 실시된다. 원시생식세포는 기저세포층에 부착되어 증식하여 콜로니를 형성된다.

- <21> 본 발명의 방법에 따라 처리된 원시생식세포는, 원시생식세포에 특이성을 나타내는 스테이지 특이 배자 항원-1 (SSEA-1)을 발현한다.
- <22> 상술한 본 발명의 방법에 의해 생식선 전이 효율이 크게 개선된 원시생식세포는 조류 키메라 또는 형질전환체에서 생식선 전이 효율을 크게 향상시킨다. 즉, 본 발명의 요지는 조류 키메라 또는 형질전환체의 생산 효율을 향상시키는 것이 아니라, 조류 키메라 또는 형질전환체에서 생식선 전이 효율을 향상시키기 위하여 원시생식세포를 처리하는 방법에 있다. 한편, 이러한 생식선 전이 효율의 개선은 인 비트로 배양된 gPGCs가 전이된 원시생식기 환경에 적응하도록 재프로그램화된 결과로 판단된다.
- <23> 본 발명의 방법은 gPGCs의 생식선 전이 효율을 개선하는 데 있어서, 그 방법의 실시가 간편하면서도 그에 의해 달성되는 생식선 전이 효율의 개선 정도가 매우 크다. 또한, 본 발명의 방법은 당업계에서 아직까지도 해결하지 못하였던, gPGCs를 이용한 효율적인 생식선 키메라 생산 시스템의 구축을 최초로 가능하게 한 것이다.
- <24> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 조류의 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하는 단계; (b) 상기 원시생식세포를 최소 5일 동안 인 비트로 배양하는 단계; (c) 상기 배양된 원시생식세포를 수용체 배자에 주입하는 단계; 및 (d) 상기 수용체 배자를 포함하는 난을 배양 및 부화하여 생식선 키메라 조류 개체를 수득하는 단계를 포함하는 생식선 전이 효율이 개선된 조류 생식선 키메라의 제조방법을 제공한다.
- <25> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 조류의 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하는 단계; (b) 상기 원시생식세포에 외래 유전자를 전이하는 단계; (c) 상기

외래 유전자가 전이된 원시생식세포를 최소 5일 동안 인 비트로 배양하는 단계; (d) 상기 배양된 원시생식세포를 수용체 배자에 주입하는 단계; 및 (e) 상기 수용체 배자를 포함하는 난을 배양 및 부화하여 조류 형질전환체를 생산하는 단계를 포함하는 생식선 전이 효율이 개선된 조류 형질전환체의 제조방법을 제공한다.

- <26> 상기 본 발명의 두 방법은 상술한 본 발명의 원시생식세포의 생식선 전이 효율을 개선하는 방법을 이용하기 때문에, 그 발명들 사이의 공통 사항은 본 명세서의 복잡성을 야기하는 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- <27> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 원시생식세포는 SSEA-1을 발현하기 때문에, 수용체 배자에 주입하기 전에, 상기 인 비트로 배양된 원시생식세포가 원시생식세포인지 여부를 확인하는 단계를 실시한다. 이러한 확인 과정은 면역염색 (immunostaining)을 통하여 실시할 수 있으며, SSEA-1을 이용한 면역염색 방법은 은 Solter 및 Knowles의 문헌 (13)에 개시되어 있다.
- <28> 원시생식세포를 수용체 배자에 주입하는 방법은 다양한 방법에 따라 실시될 수 있으며, 바람직하게는 배자의 대동맥에 주입하여 실시된다. 예를 들어, 적합한 개수의 원시생식세포 포함을 포함하는 세포 혼탁액을 배자의 등쪽 대동맥에 미세바늘로 주입하고, 밀봉한 다음 적합한 시간 동안 배양하여 실시된다. 한편, 수용체 배자는 다양한 발달 단계에 있는 것이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 배발달 스테이지 약 13-19 (약 2 일령-2.5 일령), 가장 바람직하게는 배발달 스테이지 약 19 (약 2.5일령)된 것이다.

- <29> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 원시생식세포에 외래 유전자를 전이하는 단계는 리포좀-매개 형질감염 또는 전기동공법 (electroporation)에 의해 실시된다. 상기한 전기동공법은 본 발명자들이 개발한 방법에 따라 실시하는 것이 가장 바람직하다 (참조: 특허 제 305715 호).
- <30> 한편, 수용체 배자로의 효율적인 주입을 위하여, 원시생식세포의 파풀레이션 비율을 증가시키기는 데 피콜 농도구배에 의한 분리가 이용될 수 있다 (14). 또한, 앞선 연구들에 따르면, 피콜 처리가 원시생식세포의 분리에 효율적이며, 원시생식세포의 생존성에는 영향을 미치지 않은 것으로 보고되어 있다. 그러나, 하기의 실시예에 기재된 본 발명자들의 실험에 따르면, 피콜에 의한 원시생식세포의 분리는, 본 발명의 시스템에서 원시생식세포의 생식선 전이 효율에 포지티브한 효과를 발휘하지 않으며, 오히려 생식선 전이 효율을 감소시킬 수 있다. 따라서, 본 발명은 피콜 처리에 대한 요구를 완전하게 제거할 수 있는 장점이 있어, 생식선 키메라 및 형질전환체의 제조과정을 보다 단순하고 편리하게 할 수 있다.
- <31> 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 외래 유전자는 선택 마커로서 항생제 내성 유전자를 포함하고, 상기 (c) 단계 이후에 항생제 내성을 나타내는 원시생식세포를 선택하는 단계가 추가적으로 포함되며, 상기 (d) 단계는 항생제 내성을 나타내는 원시생식세포로 실시된다. 본 발명에서 이용될 수 있는 선택 마커는, 진핵세포에 항생제를 부여하는 어떠한 유전자도 가능하며, 예컨대, 네오마이신, 푸로마이신 및 제오마이신 내성 유전자를 포함한다. 선택 마커를 이용하는 경우에는, 상기 인 비트로 배양에 이용되는 배지는 그 내성 유전자에 해당하는 항생제를 포함한다.
- <32> 본 발명의 방법에 따르면, gPGCs를 이용한 키메라 또는 형질전환체 조류의 생산 시스템에 있어서, 생식선 전이 효율을 크게 개선시킬 수 있다.

<33> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이를 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이를 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<34>

실시예

<35> 실험 방법

<36> I. gPGCs의 회수 및 배양

<37> 원시생식세포는 한국 오골계 (Korean Ogo1 Chicken: KOC)로부터 얻는 스테이지 28 (5.5 일 부화)의 배자의 원시생식기로부터 회수하였다. 스테이지 28의 배자를 칼슘- 및 마그네슘-결여 PBS (phosphate buffered saline)로 세척하여 난황을 제거하였고, 이어 배자의 배 부위를 실체현미경 하에서 날카로운 칼날로 절단하여 원시생식기를 회수하였다. 회수한 원시생식기에 0.53 mM EDTA가 함유된 0.05% (v/v) 트립신 용액을 첨가하고, 이를 부드럽게 파이펫팅하여 원시생식기 조직을 분리시켰다. 200 x g에서 5분 동안 원심분리한 다음, 본 발명자들이 제시한 일반적인 프로토콜에 따라 (15), 원시생식기 조직으로부터 분리한 1×10^4 세포를 96-웰 플레이트에 씨딩하였다. 초기 데이터에 따르면 씨딩된 원시생식기 세포의 약 1%가 gPGC이기 때문에, 하나의 웰에 씨딩된 gPGCs의 수는 100-120 이었다. 10% (v/v) 우태아혈청 (FBS; Gibco BRL), 2% (v/v) 닭 혈청 (Gibco BRL), 1 mM 소듐 피루베이트 (Sigma Co, St Louis, MO), 55 μ M β -미르캡토에탄올 (Sigma), 20 ng/ml 콘알부민 (Sigma), 10 mM Hepes (Gibco BRL), 1 x

항생제-안티마이코티스 (Sigma), 5 ng/ml 인간 간세포 인자(hSCF; Sigma), 5 유니트/ml 쥐 류 케미아 억제 인자 (mLIF; Sigma), 10 ng/ml 소의 염기성 섬유아세포 성장 인자 (bFGF; Sigma), 0.04 ng/ml 인간 인터루킨-11 (hIL-11; Sigma) 및 10 ng/ml 인간 인슐린-유사 성장인자-I (hIGF-I; Sigma)가 함유된 Dulbecco's 최소 필수 배지 (Gibco BRL, Grand Island, NY)에서 상기 씨딩된 세포를 배양하였다. 이어, 분리된 gPGCs를 CO₂ 배양기에서 37°C로 5-10일 동안 유지시켰다.

<38> II. gPGCs의 동정

<39> 스테이지 특이 배자 항원-1 (SSEA-1) 염색을 이용하여 gPGCs를 감별하였다. NICHD의 후원에 의해 설립되고 아이오와 대학교에 의해 유지되는 "Developmental Studies Hybridoma Bank"로부터 Solter 및 Knowles (13)에 의해 개발된 SSEA-1 항체를 입수하였다. 세포 혼탁액 내의 gPGCs를 1% (v/v) 글루타르알데히드로 5분 동안 고정하고 1 x PBS로 두 번 세척하였다. PBS 내 1:1,000 비율로 희석된 anti-SSEA-1 복수액을 첨가하고, 이어 DAKO universal LSAB™ 키트 및 폐록시다아제 (DAKO, USA)를 이용하여 제조자의 제시방법에 따라 후속 단계를 실시하였다.

<40> III. gPGCs의 수용체 배자 내로의 이식

<41> 인 비보에서 생식 세포 계열 (lineage)로 분화하는 능력을 검사하기 위하여, 0-, 5- 및 10-일 배양된 KOC gPGCs를 화이트 레그흔 (WL)의 스테이지 17 (2.5일령) 배자의 등쪽 대동맥에 주입하였다. 실험 디자인에 따라, 이식을 하기 전에 10% (v/v) 및 16% (v/v) 농도 구배를 이용하여 피콜 분리를 실시하였다. gPGC 주입을 위하여, 작은 윈도우를 수용체 난의 첨단부에 만들고, 150-200개의 gPGCs를 포함하는 세포 혼탁액 약 2-3 μ l를 배자의 등쪽 대동맥에 미세바늘로 주입하였다. 수용체 배자의 난 윈도우를 파라핀 필름으로 2회 밀봉하고, 부화가 이루어질 때까지 첨단부가 아래로 향하도록 하여 배양하였다.

<42> IV. 검정교배 분석

<43> 본 발명자들의 표준 관리 프로그램에 따라 (7), 부화된 닭을 6개월까지 유지시켰다. 이어, 각각의 닭의 무리가 난 또는 정액을 생산할 수 있는지 여부의 기준에 따라 부화된 닭의 성적 성숙을 모니터링 하였다. 그런 다음, 성적 성숙된 모든 닭에 대하여 검정교배 분석을 하기 위하여, 성숙 KOCs에 인위적 수정을 하였다. KOC의 날개 색상은 열성 색소 유전자 (*i/i*) 때문에 흑색이고, WL의 날개 색상은 우성 색소 억제 유전자 (*I/I*) 때문에 백색이다. 따라서, 검정교배에서 조작된 WL로부터 부화된 흑색 날개를 갖는 자손의 탄생은 주입된 KOC gPGCs 가 수용체 WL 배자에서 정상적으로 증식 및 분화한다는 것을 증명한다.

<44> V. 실험 디자인

<45> 각각의 처리 효과를 평가하기 위하여, 장래적 분석 (배양 기간 및 피콜 처리) 또는 소급적 분석 (키메라 성)을 실시하였다. 장래적 분석을 하기 위하여, 스테이지 28 (5.5 일령)된

KOC 배자로부터 수집한 gPGCs를 무작위적으로 5 처리군으로 나누었다: 1) 수집 및 피콜 분리 후 즉시 수용체 배자로 전이 (0일 배양), 2) 5일 배양하고 피콜 처리 후 전이, 3) 5일 배양하고 피콜 처리 없이 전이, 4) 10일 배양하고 피콜 처리 후 전이, 그리고 5) 10일 배양하고 피콜 처리 없이 전이. 수집 후 기저세포 조직으로부터 gPGC를 분리하는 것은 수집된 조직에서 1% 미만이라는 낮은 파풀레이션 때문에 단지 피콜 처리 후에 실시할 수 있으므로, 장래적 분석에 있어서, 피콜 처리 없이 0일-배양된 gPGCs의 전이는 배제하였다.

<46> 생식선 키메라의 생산 및 생식선 전이 효율에 대한 각각의 처리 효과를 평가하는 데에, 검정교배 키메라 생산 시스템이 이용되었다. 키메라 성에 대한 소급적 데이터를 장래적 실험과 통합을 시켰다. 실험 변수의 전체 세트로부터 얻은 값을 SAS 프로그램에서 일반적 선형 모델 (PROC-GLM)을 이용하는 ANOVA에 적용하였다 (16). 각각의 실험 변수에서 주 효과의 유의성이 검출되는 경우, 처리 효과를 최소제곱법으로 비교하였다. P 값이 0.05 미만일 때, 처리들 사이의 유의적 차이가 결정되었다.

<47> 실험 결과

<48> I. 원시생식기 유래 기저세포와의 gPGC 배양의 일반적 측면

<49> gPGCs를 배양하기 위하여, 닭 원시생식기 유래 기저세포를 피더 세포층으로 이용하였고, 배자 원시생식기 내에 있는 기저세포 및 gPGCs의 혼합된 파풀레이션을 배양 용기에 동시에 씨딩하였다. 기저세포는 신속하게 증식하여 씨딩 후 5일 이내에 컨플루언트 단일층을 형성한 반면, gPGCs는 기저세포 피더 세포층 위에서 느리게 증식을 하였고, 배양 후 7일째에 콜로니를 형성하였다 (도 1). 상기 콜로니

들은 컨플루언트 기저세포층에 견고하게 결합이 되어 있었고, 예컨대, 세포층으로부터 분리와 같은 세포 퇴화 신호는 배양 동안에 관찰되지 않았다. gPGC 콜로니들은 스테이지 특이 배자 항원 (SSEA)-1 에피토프를 배양 동안 발현하였고, 이는 원시생식세포의 전형적 특성을 보여주는 것이다.

<50> II. 생식선 키메라 생산에 대한 처리 효과

<51> 수용체 당 150–200개의 gPGCs를 주입하였고, gPGC 주입 후, 총 683 마리의 닭이 부화되었다. 6개월까지의 관리 후, 301 마리 (44.1%)는 성 성숙하였다. 이들은 차후의 검정교배 실험에 제공되었다.

<52> 【표 1】

인 비/트로 배양 기간 (일)	피콜 처리(+) 또는 비처 리(-)	정적 성숙된 부화된 닭의 수 ^a	생산된 생식선 키메라 수 (%) ^b
0	+	39	2(5.1)
5	+	35	4(14.4)
	-	74	8(10.8)
10	+	91	6(6.6)
	-	62	7(11.3)
총 합		301	27(9.0)

^a성 성숙된 닭만을 검정교배 실험에 이용하였다.
^b검정교배 실험에 이용된 생식선 키메라 닭의 수의 백분율

<53> 상기 표 1에서 생식선 키메라의 수에 대한 처리의 모델효과는, p 값으로 나타내어 0.6831이었다.

<54> 표 1에서 볼 수 있듯이, 27 마리의 닭 (웅성 15 마리 및 자성 12 마리)은 자손 실험에서 생식선 키메라로 입증되었다. 키메라에 대한 성 성숙된 닭의 비율은 9.0% (27/301)이었다. 각각의 처리에 있어서 생식선 키메라 생산의 범위는 5.1% 내지 14.4%이었고, 키메라 생산에 있

어서 유의적 처리 효과는 발견되지 않았다 ($p=0.6831$). 상기한 실험 결과는 생식선 키메라의 생산 효율은 상술한 실험적 처리에 의해 영향을 받지 않음을 보여준다.

<55> III. 성숙된 키메라에서 생식선 전이의 효율에 대한 처리 효과

<56> 이어, 본 발명자들은 생식선 전이의 효율에 미치는 처리 효과를 비교 실험으로서 실시하였다. 장래적 분석 및 소급적 분석으로 구성된 각각의 처리군의 디자인이 만들어졌지만, 총 처리군은 9개이었고, 0일 배양군은 피콜 처리군만을 포함하며 0일-배양된 gPCGs의 피콜 처리 후 전이에 의해서는 단지 웅성 키메라만 생산되었다. 상술한 불완전한 팩토리얼 배분 때문에, 완전한 블록 디자인이 통계적 분석을 위하여 이용되었다.

<57> 【표 2】

생식선 키메라 생산 시스템					
배양기간 (일)	피콜 처리 (+) 또는 비처리 (-)	키메라 성	생식선 키메라로 제공된 닭의 수	부화된 닭의 수	공여체-유래 생 산된 KOCs의 수 (%) ^a
0	+	웅성	2	684	4(0.6) ^b
5	+	웅성	3	664	10(1.5) ^b
5	+	자성	1	59	1(1.7) ^{bc}
5	-	웅성	5	269	21(7.8) ^{cd}
5	-	자성	3	107	3(2.8) ^{bc}
10	+	웅성	2	639	162(25.4) ^e
10	+	자성	4	291	31(10.7) ^d
10	-	웅성	3	185	92(49.7) ^f
10	-	자성	4	376	168(44.7) ^f

^a부화된 닭의 수의 백분율로서 공여체-유래 자손을 나타낸다.
 생산된 공여체-유래 한국 오골계 (KOC)의 다른 윗첨자는 유의적으로 차이가 있었다, $p<0.05$

<58> 표 2에서 볼 수 있듯이, 유의적 ($p<0.0001$) 모델 효과가 확인되었다. 생식선 전이의 효율은 배양기간이 증가할수록 크게 향상이 되었다 (0일, 5일 및 10일)

배양에서 각각 0.6%, 1.5–7.8% 및 10.7–49.7%). 동일한 인 비트로 배양 기간에서, 생식선 전이는 피콜-처리군 보다 피콜-비처리군에서 개선된 효율을 나타내었다. 상기한 효과는 10일 배양군에서 보다 명백하게 나타났고, 키메라 성에 무관하게 생식선 전이의 유의적 ($p<0.0001$) 증가가 확인되었다 (44.7–49.7% vs. 10.7–25.4%). SSEA-1 항체를 이용한 면역조직학적 분석은, 세포 혼탁액 내 gPGC 파플레이션이 피콜 처리군과 비처리군에서 차이가 없음을 나타내었다. 따라서, gPGCs 파플레이션의 증가와 같이 이식을 위한 충분한 수의 gPGCs 회수를 위한 추가적인 처리는 피콜-비처리군에서는 필요하지 않았다. 키메라 성은 전이 효율에 영향을 미치지 않았고, 피콜 처리된 10일 배양군을 제외하고, 동일한 배양기간과 피콜 처리 하에서 상이한 성 사이의 유의적 차이는 발견되지 않았다 ($p=0.6011$). 상이한 gPGC 준비 시스템으로부터 유래된 각각의 키메라에서 생식선 전이의 유도는 표 3에서 추가적으로 정리되어 있다.

<59>

【표 3】

생식선 키메라 생산 시스템

배양 기간(일)	피콜 처리(+) 및 비처리(-)	키메라 성	생식선 키메라 의 ID	부화된 닦의 수	생산된 공여체-유래 KOCs의 수 (%) ^a
0	+	웅성	001	342	2(0.6)
0	+	웅성	011	342	2(0.6)
5	+	웅성	501	332	3(0.9)
5	+	웅성	502	35	1(2.9)
5	+	웅성	503	297	6(2.0)
5	+	자성	513	59	1(1.7)
5	-	웅성	505	65	1(1.5)
5	-	웅성	510	78	1(1.3)
5	-	웅성	511	40	1(2.5)
5	-	웅성	554	54	9(16.7)
5	-	웅성	568	32	9(28.1)
5	-	자성	515	32	1(3.1)
5	-	자성	547	40	1(2.5)
5	-	자성	560	35	1(2.9)
10	+	웅성	A27	334	6(1.8)
10	+	웅성	A32	305	156(51.1)
10	+	자성	A34	45	1(2.2)
10	+	자성	A40	88	2(2.3)
10	+	자성	A43	65	27(41.5)
10	+	자성	A44	93	1(1.1)
10	-	웅성	B01	25	14(56.0)
10	-	웅성	B04	16	1(6.3)
10	-	웅성	B17	144	77(53.5)
10	-	자성	C01	92	52(56.5)
10	-	자성	C04	98	38(38.8)
10	-	자성	C05	37	2(5.4)
10	-	자성	C08	149	76(51.0)
총 합				3,274	492(15.0)

^a부화된 닦의 백분율로서 공여체-유래 자손을 나타낸다.

<60> 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위

가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<61> 이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명은 조류 원시생식세포의 생식선 전이 효율을 개선하는 방법, 생식선 전이 효율이 개선된 조류 생식선 키메라의 제조방법 및 생식선 전이 효율이 개선된 조류 형질전환체의 제조방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 gPGCs의 생식선 전이 효율을 개선하는 데 있어서, 그 방법의 실시가 간편하면서도 그에 의해 달성되는 생식선 전이 효율의 개선 정도가 매우 크다. 또한, 본 발명의 방법은 당업계에서 아직까지도 해결하지 못하였던, gPGCs를 이용한 효율적인 생식선 키메라 생산 시스템을 구축하는 것을 가능하게 한다.

<62> 참조 문헌

- <63> 1. Hamburger V, Hamilton HL. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J Morphol* 1951; 88:49-92.
- <64> 2. Swift CH. Origin and early history of the primordial germ cells in the chick. *Am J Anat* 1914; 15:483-516.
- <65> 3. Nieuwkoop PD, Sutasurya LA. The migration of the primordial germ cells. In *Primordial Germ Cells in the Chordates*. London: Cambridge University Press; 1979:113-127.

- <66> 4. Wentworth BC, Tsai H, Hallett JH, Gonzales DS, Rajcic-spasojevic G. Manipulation of avian primordial germ cells and gonadal differentiation. *Poultry Sci* 1989; 68:999-1010.
- <67> 5. Jeong DK, Park TS, Kim DK, Song KD, Hong YH, Han JY. Production of germline chimeric chickens using primordial germ cells from germinal crescent and blood. *Kor J Anim Sci* 1999; 41:621-628.
- <68> 6. Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* 1994; 39:153-161.
- <69> 7. Chang IK, Jeong DK, Hong YH, Park TS, Moon YK, Ohno T, Han JY. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. *Cell Biol Int* 1997; 8:495-499.
- <70> 8. Sang H. Transgenic chickens-methods and potential applications. *Trends Biotechnol* 1994; 12:415-420.
- <71> 9. Carsience RS, Clark ME, Verrinder Gibbins AM, Etches RJ. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 1993; 117:669-675.
- <72> 10. Pain B, Clark ME, Shen M, Nakazawa H, Sakurai M, Samarut J, Etches RJ. Long-term *in vitro* culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 1996; 122:2339-2348.

- <73> 11. Chang I, Yoshiki A, Kusakabe M, Tajima A, Chikamune T, Naito M, Ohno T. Germ line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. *Cell Biol Int* 1995; 19:569-676.
- <74> 12. Tajima A, Naito M, Yahuda Y, Kuwana T. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *J Zool* 1998; 280:265-267.
- <75> 13. Solter D, Knowles BB. Monoclonal antibody defining a stage-specific mouse embryonic antigen (SSEA-1). *Proc Natl Acad Sci* 1978; 75:5565-5569.
- <76> 14. Yasuda Y, Tajima A, Fujimoto T, Kuwana T. A method to obtain avian germ-line chimeras using isolated primordial germ cells. *J Reprod Fertil* 1992; 96:521-528.
- <77> 15. Park TS, Han JY. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol Reprod Dev* 2000; 56:475-482.
- <78> 16. Anon. SAS Users Guide. Statistics. Cary, NC: Statistical Analysis System Institute; 1992

【특허 청구범위】**【청구항 1】**

다음의 단계를 포함하는 조류 원시생식세포의 생식선 전이 효율을 개선하는 방법:

- (a) 조류 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하는 단계; 및
- (b) 상기 원시생식세포를 최소 5일 동안 인 비트로 배양하는 단계.

【청구항 2】

다음의 단계를 포함하는 생식선 전이 효율이 개선된 조류 생식선 키메라의 제조방법:

- (a) 조류 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하는 단계;
- (b) 상기 원시생식세포를 최소 5일 동안 인 비트로 배양하는 단계;
- (c) 상기 배양된 원시생식세포를 수용체 배자에 주입하는 단계; 및
- (d) 상기 수용체 배자를 포함하는 난을 배양 및 부화하여 생식선 키메라 조류 개체를 수득하는 단계.

【청구항 3】

다음의 단계를 포함하는 생식선 전이 효율이 개선된 조류 형질전환체의 제조방법:

- (a) 조류 배자의 원시생식기로부터 원시생식세포를 분리하는 단계;
- (b) 상기 원시생식세포에 외래 유전자를 전이하는 단계;
- (c) 상기 외래 유전자가 전이된 원시생식세포를 최소 5일 동안 인 비트로 배양하는 단계;

- (d) 상기 배양된 원시생식세포를 수용체 배자에 주입하는 단계; 및
- (e) 상기 수용체 배자를 포함하는 난을 배양 및 부화하여 조류 형질전환체를 생산하는 단계.

【청구항 4】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조류는 닭, 메추라기, 칠면조, 오리, 거위, 꿩 또는 비둘기인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 최소 8일 동안 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 최소 10일 동안 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 세포성장인자 및 분화억제인자가 포함된 배지에서 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 7 항에 있어서, 상기 세포성장인자는 간세포인자, 섬유아세포성장인자, 인터루킨-11, 인슬린-유사 성장인자-1 및 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

제 7 항에 있어서, 상기 분화억제인자는 류케미아 억제인자인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 10】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 조류 혈청, 포유류 혈청 및 그의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택되는 혈청을 포함하는 배지에서 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 11】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 원시생식세포의 인 비트로 배양은 원시생식기-유래 기저세포층 위에서 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 12】

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b)에서 인 비트로 배양된 원시생식세포는 스테이지 특이 배자 항원-1 (SSEA-1)을 발현함을 특징으로 하는 방법.

【청구항 13】

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 상기 원시생식세포를 수용체 배자에 주입하는 단계는 원시생식세포를 수용체 배자의 대동맥에 주입하여 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제 3 항에 있어서, 상기 원시생식세포에 의해 유전자를 전이하는 단계는 리포좀-매개 형질감염 또는 전기동공법 (electroporation)에 의해 실시됨을 특징으로 하는 방법.

【청구항 15】

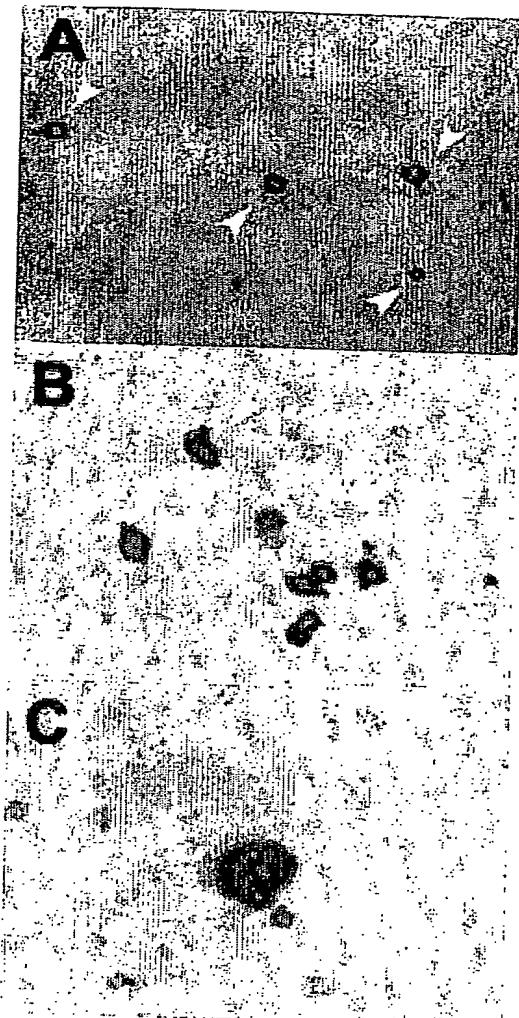
제 3 항에 있어서, 상기 외래 유전자는 선택 마커로서 항생제 내성 유전자를 포함하고, 상기 (c) 단계 이후에 항생제 내성을 나타내는 원시생식세포를 선택하는 단계가 추가적으로 포함되며, 상기 (d) 단계는 항생제 내성을 나타내는 원시생식세포로 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

10 25158

출력 일자: 2004/5/6

【도면】

【도 1】



10 025158

출력 일자: 2004/5/6

【도 2】

